

③

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-274039

(43)Date of publication of application : 21.10.1997

(51)Int.Cl.

G01N 33/537

G01N 33/50

G01N 33/53

G01N 33/543

G01N 33/543

G01N 33/545

G01N 33/68

// G01N 33/577

(21)Application number : 08-081266

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 03.04.1996

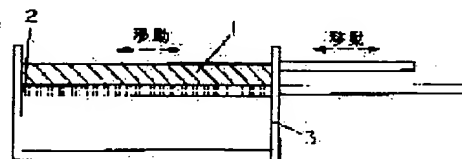
(72)Inventor : NAKAYAMA HIROSHI
MIYAZAKI KIMIMASA

(54) DIAGNOSTIC APPARATUS MAKING USE OF IMMUNOLOGICAL TECHNIQUE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a diagnostic apparatus by which the existence of an object to be detected can be judged simply by a method wherein a sample which exists in a liquid is reacted with a labeled antibody or the like and a filter which is used to sort a reacted substance from an unreacted substance according to a physical size is used.

SOLUTION: In a diagnostic kit, a sample which exists in a liquid is reacted with an antibody which is bonded immunologically to the sample or with an antibody which is bonded immunologically to the sample and which is labeled. After that, a filter 2 which sorts a reacted substance from an unreacted substance according to a physical size is used, and the existence of the sample is detected or the sample is measured quantitatively. Then, when one kind of a polyclonal antibody or two or more kinds of monoclonal antibodies exist, an object to be detected can be detected, and a complicated selection means to combine antibodies is not required. In addition, the diagnostic kit is important in order to detect a human villous gonad stimulant hormone which is utilized especially as a marker for the diagnosis of a pregnant woman.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2000 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-274039

(43) 公開日 平成9年(1997)10月21日

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/537			G 0 1 N 33/537	
33/50			33/50	J
33/53			33/53	D
33/543	5 4 5		33/543	5 4 5 D
	5 8 1			5 8 1 D
審査請求 未請求 請求項の数9 OL (全 5 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-81268

(22) 出願日 平成8年(1996)4月3日

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 中山 浩

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

(72) 発明者 宮崎 仁誠

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 滝本 智之 (外1名)

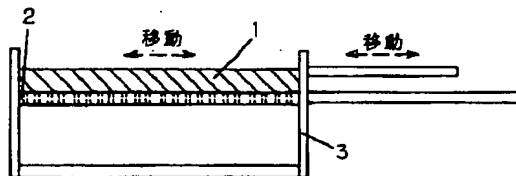
(54) 【発明の名称】 免疫学的手法を利用した診断装置

(57) 【要約】

【課題】 簡便に検出対象物の有無を判定することが可能な診断キットの提供。

【解決手段】 標識あるいは未標識抗体を含浸させた部材とその下部に反応体と未反応体を物理的に分別するフィルタ部材を備えている。

1 抗体含浸部材
2 フィルタ
3 容器



【特許請求の範囲】

【請求項1】 液体中に存在する試料と、前記試料に対して免疫学的に結合する抗体あるいは、前記試料に対して免疫学的に結合しかつ標識した抗体とを反応させた後、その反応物と未反応物を物理的の大きさにより分けるためのフィルタを備えており、前記試料の有無を検知あるいは定量的に測定することを特徴とする診断装置。

【請求項2】 液体中に存在する試料と、前記試料に対して免疫学的に結合する抗体あるいは、前記試料に対して免疫学的に結合しかつ標識した抗体とを反応させた後、その反応物と未反応物を物理的の大きさにより試料の有無を検知あるいは定量的に測定する診断装置であって、反応物を保持することにより試料の有無を検知できる部材と未反応物を含む溶液を吸収するための部材からなることを特徴とする診断装置。

【請求項3】 液体中に存在する試料と、その試料に対して免疫学的に結合する抗体あるいは、その試料に対して免疫学的に結合しかつ標識した抗体とを反応させた後、その反応物と未反応物を物理的の大きさにより試料の有無を検知あるいは定量的に測定する診断キットであって、抗体あるいは標識した抗体を乾燥状態で含んでいる部材と反応物を保持することにより試料の有無を検知できる部材と未反応物を含む溶液を吸収するための部材からなることを特徴とする診断装置。

【請求項4】 試料が、生体機能物質である蛋白質、多糖、核酸、多糖あるいは脂質であることを特徴とする請求項1、2または3記載の診断装置。

【請求項5】 抗体がモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体あるいはこれら抗体を酵素処理したものであることを特徴とする請求項1、2または3記載の診断装置。

【請求項6】 標識が、酵素、蛍光物質、色素、染色ゲル、金属コロイド、金属酸化物コロイドあるいはラテックスをはじめとする粒状ポリマであることを特徴とする請求項1、2または3記載の診断装置。

【請求項7】 フィルタが、10nm以上10μm以下の孔径を有することを特徴とする請求項1、2または3記載の診断装置。

【請求項8】 試料となる蛋白質が、hCG、CRP、LH、GH、IgG、CEA、αFP、LDH、FSH、TSH、LH-RHであることを特徴とする請求項1記載の診断装置。

【請求項9】 液体中に存在する絨毛性性腺刺激ホルモンと、その絨毛性性腺刺激ホルモンに対して免疫学的に結合する抗体あるいは、その絨毛性性腺刺激ホルモンに対して免疫学的に結合しかつ標識した抗体とを反応させた後、その反応物と未反応物を物理的の大きさにより試料の有無を検知あるいは定量的に測定する診断キットであって、抗体あるいは標識した抗体を乾燥状態で含んでいる部材と反応物を保持することにより絨毛性性腺刺激ホルモンの有無を可視的に検知できる部材と未反応物を含む溶液を吸収するための部材からなることを特徴とする妊娠診断装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、蛋白質を初めとする生体機能性物質の診断に関するものである。この診断装置は体液中に分泌する物質を検出する手段として利用することができ、特に医療の分野に有用である。

【0002】

【従来の技術】 これまでに、抗体を利用して非検出物質を検出する方法として酵素免疫測定法、ラテックス凝集法あるいはサンドイッチ法を利用した免疫クロマトグラフィーなどの方法がある。特に近年よく利用される方法は、サンドイッチ法を利用した免疫クロマトグラフィーであり、他の方法に比べて簡便に検出することができる。この方法は、少なくとも2種類の抗体を利用して一方の抗体は液相中で移動可能で標識されている。他方はクロマト担体に永久的に固定化されている。試料を添加するとまず標識された抗体と試料が反応し、その後結合物の状態でクロマト担体中を移動し、固定化部に来るとそこでトラップされる。この方法については、多くの特許出願がされており、一例を挙げると、エリー・バ 出願（特開平5-150881、平5-150882、平2-503925）、7ギット出願（特開昭62-242872）、ハイブリテック出願（特開昭60-502364）あるいはベーリングウェル出願（特開昭60-279418）がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 従来の方法では、hCGをはじめとする検出対象物を検出する際に、サンドイッチ法という手法を利用している。この手法は、少なくとも2種類以上のモノクローナル抗体が必要であるとともにその組み合わせが重要である。また、ポリクローナル抗体を使用する場合にはその他に1種類以上のモノクローナル抗体が必要であるとともにその組み合わせも重要である。このような組み合わせを選定するためには、一般的には酵素免疫測定法（ELISA）を利用して行うが、よい組み合わせが見つからない場合、再度抗体を作製することから始めなければならない欠点があった。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、液体中に存在する試料（hCGを初めとする測定対象物）と、その試料に対して免疫学的に結合する抗体あるいは、その試料に対して免疫学的に結合しかつ標識した抗体とを反応させた後、その反応物と未反応物を物理的の大きさにより分けるためのフィルタを備えており、試料の有無を検知あるいは定量的に測定することを特徴とする診断キットであり、このような測定原理により1種類のポリクローナル抗体あるいは2種類以上のモノクローナル抗体が存在すれば、その検出対象物を検出することができる。このことにより、抗体の組み合わせという煩雑な選定手段を講じることなく検出対象物である試料を検出することができる。

【0005】

【発明の実施の形態】 本発明による診断キットを利用する

ことにより、得られた抗体の組み合わせを選定することなく、hCGを初めとする測定対象物の診断キットを得ることが可能となる。

【0006】2種類のモノクローナル抗体あるいは1種類のポリクローナル抗体及び、10nm以上のサイズを有するフィルタ、好ましくは着色されているフィルタを利用して、図1に示した構成の診断キットによりhCG、CRP、LH、GH、IgG、CEA、 α FP、LDH、FSH、TSH、LH-RHを検出できる。

【0007】さらに、図2に示したように未反応物を含む溶液を積極的に除去吸収するための部材を導入した診断キットによりhCG、CRP、LH、GH、IgG、CEA、 α FP、LDH、FSH、TSH、LH-RHを検出できる。

【0008】また、標識した抗体、特に好ましくは色素あるいは酵素標識された抗体を用いることによりフィルタの色に関係なく高感度に検出することができる。特に、妊娠診断のマーカーとして利用されている人絨毛性腺刺激ホルモンを検出するための診断キットは重要であり、以下に一実施例として詳細に記述する。

【0009】〔抗体の作製〕

(免疫) 精製hCG(純度:98%以上、SDS電気泳動検定)をPBSを用いて2mg/mlに調整し、これに同体積の72 μ g/ml(ヒト結核死菌含有完全アジュバント、和光純薬製、H37Rv)を添加し、よく混合し、1000rpmで乳化した。生後約8週のマウス(A/J)20匹に免疫原を含むアジュバントエマルジョンを100 μ lずつ注射した。3週間後、2mg/ml hCG溶液と同体積の不完全アジュバントを混合し、このエマルジョンをA/Jマウスに100 μ lずつ注射した。

【0010】その後、6、9、12週間後に再度hCGを含む不完全アジュバントエマルジョンをマウスに100 μ lずつ注射した。注射後、1週間目に採血し、以下に示す抗体産生を確認した。

【0011】(抗体産生の確認) 採取した血清を、以下に示す酵素免疫測定法(ELISA)で抗体産生の確認をした。固相として2.5 μ g/mlに0.1mg/ml BSA・PBS・Azで調整したhCGを100 μ l/ウェルずつ使用した。

【0012】第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体あるいはペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体を使用した。

【0013】その結果、すべてのマウスにおいて抗hCG抗体の産生が認めらるとともに、IgG/IgM比が100以上ありクラススイッチが起きていること確認した。

【0014】(細胞融合) 免疫したマウスの中、特に力価の高かった2匹についてマウスの脾臓を肥大させるために、ブーラスト(弱い免疫原の注射)した。免疫原は、1mg/ml hCG溶液をアジュバントを加えずにそのまま用いた。

【0015】ブーラスト後3日を経過したマウスの脾臓細胞を摘出し、平均分子量1,500のポリビニルピロリドを用いた常法により、マウス骨髓腫由来細胞ライン(P3X63-Ag8.653)と融合した。フィーダー(成長因子を供給する細胞)として同じマウスの脾臓細胞を用い、96ウェルプレート2枚の上で15%のウシ胎児血

清(以下、FCS)を含むインファ培地で1日間培養した後(100 μ l/ウェル)、2倍濃度のHAT培地を100 μ l/ウェル添加してCO2インキュベーター(CO2濃度:5%、温度:37 $^{\circ}$ C、湿度:95%)内で1週間培養した。その後、培養上清を除いた後、15%のFCSを含むHT培地(250 μ l/ウェル)と交換した。

【0016】(細胞選別) HT培地と交換1週間後、培養上清を200 μ l/ウェルずつ取り出した。15%のFCSを含むHT培地(200 μ l/ウェル)を添加し、3日間培養した後培養上清を200 μ l/ウェルずつ取り出した。合計で培養上清を400 μ l/ウェルを得ることができた。

【0017】この培養上清を用いて以下に示すELISA法によりhCG、hCG- α 、hCG- β に対する結合能を測定した。

【0018】固相として2.5 μ g/mlに0.1mg/ml BSA・PBS・Azで調整したhCG、hCG- α 、hCG- β を100 μ l/ウェルずつ使用した。抗体液として細胞培養上清を使用した。

【0019】この結果、hCG、hCG- α に対してのみ結合能を示したものは2ウェルあり、hCGおよびhCG- β に対してのみ結合能を示したものは2ウェルあった。また、すべてのウェルに対して結合能を示したものは、4ウェルあった。

【0020】(クローニング) 上記8ウェルの細胞についてウェルあたり1 μ lの細胞が含まれる濃度に希釈(限界希釈)し、96ウェルのマイクロプレート8枚に分注した。フィーダーとして生後5週のマウス(Balb/c)の胸腺細胞を用いて初期増殖を促した。プレートのサイズを上げながら培養を進め、適時上清についてELISA法によるスクリーニングを繰り返し、hCGに対して高い力価を示し、かつ良好な増殖を示している細胞ラインを最終的に選別し、200ml中で5x10⁵細胞/mlの濃度に至るまで培養を進めた。

【0021】その結果、hCG、hCG- α に対してのみ結合能を示し、かつhCGに対して親和性の高かった1株、およびhCGおよびhCG- β に対してのみ結合能を示し、かつhCGに対して親和性の高かった1株を選定した。

【0022】(細胞の保存) 最終的に選別された細胞ラインは、上清を遠心分離し、5x10⁶細胞/mlの濃度でFCS:ジメチルスルホキシド=9:1の溶液1mlに浮遊させ、-80 $^{\circ}$ Cで凍結した後、-135 $^{\circ}$ Cに移して長期保存状態にした。

【0023】(抗体の精製) 選んだ2株について大量培養を行い、その上清を遠心分離より単離した。各株の細胞培養上清についてブローチンA結合ゲル(ブローチンAセファロースCL-4B、ファルマシア製)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより細胞培養上清から各モノクローナル抗体を精製した。このモノクローナル抗体はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により、標準蛋白との比較から、精製抗体は分子量約50,000の α 鎖と約25,000の β 鎖からなるIgGであることを確認した。

【0024】(抗体の評価) 上記のアフィニティークロマトにより精製した2種類のモノクローナル抗体について以下に示すELISA法で抗体評価を行った。

【0025】その結果、hCG、hCG- α に対してのみ結合能を示した1株(細胞ライン名:MN- α 1)についてhCGに対する結合能力を測定した。hCGおよびhCG- β に対してのみ結

合能を示した1株(細胞ライン名:MN-β3)についてhCGに対する結合能力を測定した。

【0026】MN-α1では、10-9Mより高い濃度のhCGを検出することができた。また、MN-β3でも、10-9Mより高い濃度のhCGを検出することができた。

【0027】また、ここではデータを示さないが、各細胞ラインについて再度各細胞に対する結合能を測定したところ、MN-α1についてはhCG、hCG-αに対して結合能を示した。一方、MN-β3についてはhCGおよびhCG-βに対して結合能を示し、hCG-αに対しては結合能を示さなかった。

【0028】(酵素免疫測定法(ELISA法))得られた抗血清、培養上清およびモノクローナル抗体の評価をした。その操作法を以下に記載する。

【0029】(A) 抗原のコATING

2.5μg/mlになるようにhCG、hCG-α、hCG-βを0.1mg/mlBSA・PBS・Azで調整した。マイクロプレート(塩化ビニル製96ウェルプレート コスター社製)に抗原溶液を100μL/ウェル注入し、20°Cで1夜保存した。75μL/ウェルで抗原溶液を除去した。

【0030】(B) ブロック

BSA・PBS・Azを250μL/ウェル注入し、30分間室温で放置した。その後、75μL/ウェルでBSA・PBS・Azを除去した。即日以降の実験を行わないときは、この状態で、水で湿したる紙と共に4°Cで保存した。

【0031】(C) 抗体の反応

1%BSA・PBS・Azで種々の希釈率に希釈した抗体溶液(抗血清、培養上清、精製抗体等)50μL/ウェルおよび1%BSA・PBS・Az50μL/ウェルを注入した。相対的な親和性を測定する目的でインビシジョンの実験を行うときはインビシジョン溶液(hCG、hCG-α、hCG-β)50μL/ウェルを注入し、振とうしながら抗体溶液50μL/ウェルをさらに加えた。常温で3時間保存した後、75μL/ウェルで抗体溶液を除去し、PBSで3回洗浄し、75μL/ウェルで残存するPBSを除去した。

【0032】(D) 第2抗体の反応

0.2μg/mLのペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(由来(KPL社製)を1%BSAのPBS溶液に溶解したもの、あるいは0.2μg/mLのペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(由来(KPL社製)を1%BSAのPBS溶液に溶解したもの)50μL/ウェルを注入し、常温で30分放置した。75μL/ウェルで除去し、PBSで3回洗浄し、さらに75μL/ウェルで残存するPBSを除去した。

【0033】(E) 基質の反応と停止

o-フェニレンジアミン(生化学用)40mgを10mLのクエン酸-リン酸バッファー(pH5)に溶解し、使用直前に30%過酸化水素水4μLを加えた溶液(基質溶液)を100μL/ウェル注入し、室温放置した。10分後、4N硫酸を25μL/ウェル注入して反応を停止した。

【0034】(F) 測定

東洋ソーダマイクロプレートを用いて492nm以上の吸光度を測定した。通常第1列は純水を注入して参照値とし、適時(C)項のみを省いたブランク値を使用した。

【0035】(hCG抗体のゲッセル標識)得られた2種類の抗hCGモノクローナル抗体のそれぞれ500mg(0.0076mmol)ずつを20mLのPBSに溶解し、室温で攪拌しながら390mg(0.38mmol)のゲッセルクロライドのPBS溶液1mLを滴下した。室温で10分間攪拌した後、4度で一晩放置した。反応液をゲル濾過(G-25Mカラム、展開液:PBS)して40mLの抗体溶液を得た。この標識抗体溶液をガラス繊維濾紙に含浸させ、凍結乾燥した。

【0036】(ニトロセルロースフィルムの処理)ニトロセルロースフィルム(S&S社製、サイズ1μm)を1%BSA・PBS溶液に30分間浸潤する。その後、水分をよく切り、蒸留水100mLで振とうさせながら洗浄する。この操作をさらに2回繰り返す。その後、室温下で乾燥し、湿度35%以下で1時間放置する。このニトロセルロースフィルムは、湿度35%以下で遮光状態で保存することにより少なくとも3カ月は使用することができる。

【0037】(診断キットの作製)診断キットは、図3の構成をしている。上記の標識抗体含浸濾紙1の下部にサイズ1μmのニトロセルロースフィルム2を置く。さらにその下部に未反応物を吸水除去するための吸水部材3を設置する。これら1~3の部材は、容器4の中に装着されている。また、標識抗体含浸濾紙1は、左右に移動可能である。

【0038】(人絨毛性性腺刺激ホルモンの測定)図3に示した診断キットの上部より測定対象物であるhCG水溶液500μL(濃度40000IU/L)を添加した。約3分後、標識抗体含浸濾紙をスライドさせてニトロセルロースフィルムを露出した。その結果、ニトロセルロースフィルム表面は、黄色になっていた。一方、hCGを含まない水溶液500μLを添加した後、同様に含浸濾紙をスライドさせた。その結果、ニトロセルロースフィルム表面は、白色のままであった。

【0039】

【発明の効果】以上のように本発明は、得られた抗体を効率よく診断キットに導入する方法を提供する。

【0040】また、簡便に検出対象物の有無を判定することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

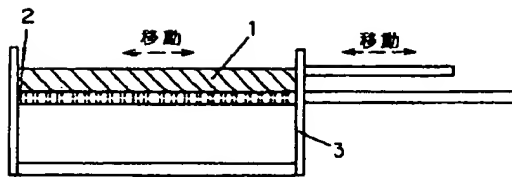
【図1】本発明の一実施例における診断キットの構成を示す図

【図2】本発明の一実施例における診断キットの構成を示す図

【図3】本発明の一実施例における人絨毛性性腺刺激ホルモンの診断キットの構成を示す図

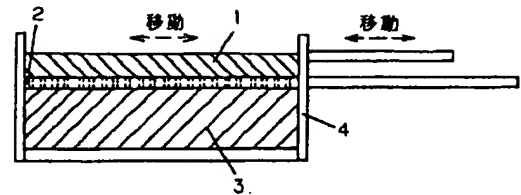
【図1】

- 1 抗体含浸部材
2 フィルタ
3 容器



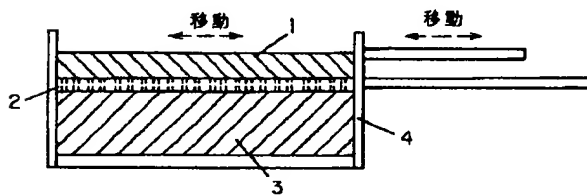
【図2】

- 1 抗体含浸部材
2 フィルタ
3 吸水部材
4 容器



【図3】

- 1 ダンシル標識した2種類の抗人絨毛性腺刺激ホルモン
... グローナル抗体含浸部材
2 フィルタ
3 吸水部材
4 容器



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

G 0 1 N 33/545

33/68

// G 0 1 N 33/577

識別記号

庁内整理番号

F I

G 0 1 N 33/545

33/68

33/577

技術表示箇所

B

A

3.0 10.0 10.0